

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16804

研究課題名（和文）性差を考慮した女性特有のサルコペニアの発症メカニズムの解明と治療応用

研究課題名（英文）Role of ER β in female-specific sarcopenia.

研究代表者

北島 百合子 (Kitajima, Yuriko)

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：40380901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、加齢に伴い骨格筋が衰えるサルコペニアが注目されている。女性は加齢に伴い卵巣からのエストロゲン分泌が低下すると、全身的機能低下が出現する。今回、骨格筋の発育・再生に関与するとされるエストロゲン受容体（ER）に着目し、骨格筋特異的ER欠損マウス（mKO）と筋幹細胞特異的ER欠損マウス（scKO）を作成した。mKOでは、筋線維面積と筋力のいずれも低下を示した。またscKOでは、筋再生力は低下を示した。エストロゲンは筋線維に発現するER β を介して筋線維の発育を促進する作用を持ち、筋幹細胞に発現するER α を介して筋再生を制御していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、女性特異的な骨格筋制御のメカニズムの一端を明らかにすることができた。これまでにあまり考慮されることがなかった性差に注目した骨格筋研究の重要性を指摘することができた。

研究成果の概要（英文）：Recently, sarcopenia, an age-related progressive loss of muscle mass and strength has been focused. Estrogens are important for comprehensively maintaining muscle function, and an insufficiency affects muscle strength and regeneration in females. In this study, we focused on estrogen receptor (ER), which is thought to be involved in skeletal muscle development and regeneration. We generated muscle-specific ER β knockout (mKO) and satellite cell-specific ER α -knockout (scKO) mice. The mKO mice showed a decrease in both muscle mass and muscle strength. The scKO mice also showed impaired muscle regeneration following acute muscle injury. ER β plays an important role in skeletal muscle development and regeneration.

研究分野：女性のヘルスケア

キーワード：エストロゲン受容体 骨格筋 女性のヘルスケア

1. 研究開始当初の背景

日本は超高齢化社会を迎え、医療経済的観点の面からも高齢者の健康寿命の延長が急務となっている。サルコペニアは、加齢に伴う骨格筋の衰えとして認識が高まってきている。これまでの国内外の研究により、女性では閉経後に毎年 0.6% ずつ筋重量が減少し、1.2% ずつ筋力が低下することが分かっている (Rolland *et al.*, 2007)。加齢による骨格筋の衰えによる転倒や、転倒による骨折・寝たきりを回避するために、筋量を維持・増加させることは極めて重要な課題となる。女性は加齢に伴い卵巣からのエストロゲン分泌が低下すると、骨粗鬆症を始めとした全身的機能低下が急速に出現するという点で、男性とは老化のプロセスが異なる。我々はこれまでに、エストロゲン欠乏マウスを用い、エストロゲン欠乏が筋力低下と筋萎縮、筋再性能不良さらに筋線維タイプの速筋化をきたし、男性のサルコペニアとは異なるメカニズムが存在することを確認した。骨格筋には、エストロゲン受容体 (ER) と (ER) の両方の subtype が発現していることが知られている。ER は、雌マウスの骨格筋におけるミトコンドリア機能や代謝恒常性の維持にとって重要である事が報告されている (Ribas V., *et al.* 2016)。一方、ER は、骨格筋の成長や再生に重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど注目されていなかったエストロゲン欠乏に伴う女性特有の筋萎縮に着目し、そのメカニズムを解明することにより性差を考慮した新しい予防・治療法を確立し、また、予防介入の時期を明らかにすることを目標に、骨格筋の成長・再生に関与するとされる ER の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方

本研究の目的を達成するために、組織や時期特異的に遺伝子をノックアウトする遺伝子改変技術である Cre-loxp システムを用いて、骨格筋特異的 ER 欠損マウス (mKO) による検証を行った。この遺伝子改変マウスを用いて、下記の項目を検証した。

(1) 遺伝子ノックアウトによる表現型の比較検証

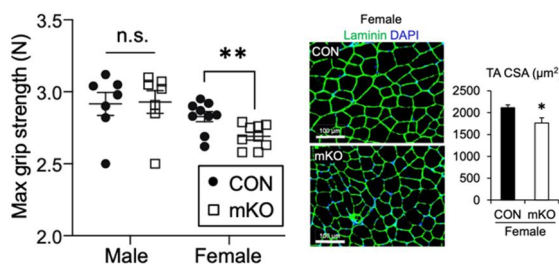
雌の骨格筋特異的 ER 欠損マウス (mKO) のノックアウトの時期を若齢期 (6~8 週齢) とし、マウスの体重増加率、握力計測器を用いて四肢筋力を計測した。また、前脛骨筋を摘出し、筋横断切片の基底膜の免疫組織染色により筋線維を可視化し、筋線維の萎縮の程度を評価した。

(2) 筋細胞による特性の評価

単一筋線維を生体から単離し培養を行うことができれば、より生体内を反映した *in vitro* での検討が可能になる。若齢期と性成熟後期の骨格筋特異的 ER 欠損マウスの長趾伸筋を摘出しコラゲナーゼ酵素処理法により単一筋線維を取り出し、72 時間培養することで骨格筋幹細胞 (サテライト細胞) を増殖させ、分化誘導させる。その後、Pax7 および MyoD の二重染色 (Zammit *et al.*, 2004) を行い、サテライト細胞の筋分化・増殖・自己複製能を評価した。

4. 研究成果

生後 6 週目に ER 欠損を誘導し、10-12 週目に前脛骨筋の筋線維面積と筋力を調べたところ、雌性 mKO マウスは野生型と比べていずれも低下を認めた (図)。この骨格筋の発育低下は、雄性マウスでは認めなかった。筋萎縮関連遺伝子の発現には変化がなかったことから、雌性マウスの骨格筋の発育低下は筋萎縮の亢進ではないことが示唆された。また、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏マウスでは、筋の発育低下に加え、速筋線維の割合が相対的に増えるが (Kitajima and Ono, *J Endocrinol* 2016)、本研究では mKO マウスにそのような質的变化は認めなかった。したがって、エストロゲンは、筋線維に発現する ER を介して筋線維の発育を促進する直接作用がある一方、筋線維 fiber type に関しては ER を介さないメカニズムの存在が示唆された。次に、筋幹細胞における ER の機能を明らかにするため、筋幹細胞特異的に薬剤 (タモキシフェン) 投与によって ER 遺伝子を欠損させる (scKO) マウスを作成した。局所的に筋損傷を誘導し、scKO マウスの筋再生能を評価したところ、野生型マウスでは効率よく筋再生が起る一方、雌性 scKO マウスの筋組織では、再生筋線維は細くコラーゲン沈着による線維がみられ、筋再生力は著しく低下していた。しかし、雄性 scKO マウスの筋再生は障害されなかった。なお、雌の筋再生障害は、卵巣摘出によりエストロゲン欠乏状態にしても増悪しなかったため、エストロゲンは筋幹細胞に発現する ER を介して筋再生を制御することが示唆された。RNA-seq 解析により遺伝子発現を評価すると、scKO 筋幹細胞において、ニッシュ関連遺伝子発現が低下していた。したがって、ER の不活性化によって幹細胞ニッシュの形成が阻害されることで筋幹細胞の増殖や生存に影響を与えた可能性が示唆され



た。上記結果は、2020年に Stem Cell Reports に掲載された。

本研究により、女性特異的な骨格筋制御の一端を明らかにすることができた。これまであまり考慮されることがなかった「性差に注目した骨格筋研究の重要性」を指摘することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daiki Seko, Ryo Fujita, Yuri Kitajima, Kodai Nakamura, Yuuki Imai, Yusuke Ono	4. 巻 8
2. 論文標題 Estrogen receptor controls muscle growth and regeneration in young female mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem cell reports	6. 最初と最後の頁 577-586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2020.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北島百合子 瀬古大暉 土屋吉史 今井祐記 小野悠介
2. 発表標題 性成熟期早期に骨格筋特異的にエストロゲン受容体 を欠損させると骨格筋は萎縮する
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------